

РЕЦЕНЗИЯ

ОТ: проф. д-р Ренета Александрова Тошкова, доктор, ИЕМПАМ– БАН, назначена със заповед №255/04.04.2019г на Директора на Институт по Невробиология, БАН за член на Научно жури по процедура за присъждане на образователна и научна степен “Доктор”, Област на висше образование: 7. Здравеопазване и спорт, Професионално направление: 7.1 Медицина, Научна специалност: “Фармакология“ (03.01.24) и избрана за официален рецензент на първото заседание на Научното жури, проведено на 12.04.2019г.

Върху: Дисертационен труд за присъждане на образователна и научна степен “Доктор”, Област на висше образование: 7. Здравеопазване и спорт, Професионално направление: 7.1 Медицина, Научна специалност: “Фармакология“ (03.01.24)

Тема на дисертационния труд: „Влияние на нестероидни противовъзпалителни средства, жлъчни киселини и техни метални комплекси върху преживяемостта и пролиферативната активност на туморни клетки“

Автор на дисертационния труд: Лора Владимирова Дякова, задочен докторант в секция “Синаптична сигнализация и комуникации“, Институт по невробиология (ИНБ), БАН.

Научни ръководители:

проф. д-р Рени Емил Калфин, ИНБ-БАН

проф. д-р Радостина Ивайлова Александрова, ИЕМПАМ-БАН

Дисертационният труд е одобрен и насочен за защита на разширено заседание на секция „Синаптична сигнализация и комуникации“, ИНБ-БАН, проведено на 26 март 2019 г. със заповед № РД -15-8 от 16.01.2018 г. на Директора на Института. Представените материали на хартиен и електронен носител са в съответствие с изискванията на закона за научните звания и степени и правилника на БАН към настоящия момент.

Дисертационният труд е посветен на актуален научен проблем в областта на здравеопазването, а именно – разработване на иновативни, високоефективни и нискотоксични средства базирани на метални съединения за терапия на злокачествени заболявания.

Дисертационният труд е написан на 329 нестандартни страници, съдържа добре структурирани и балансирани по обем всички необходими раздели: съдържание, въведение, литературен обзор, цел и задачи, материали и методи, резултати, обсъждане, изводи и приноси. Библиографската справка включва 350 литературни източника, от които 38 на кирилица и 312 на

латиница. Трудът е богато илюстриран с 95 фигури повечето от които комбинирани и 55 таблици, разпределени както следва: 11 фигури и 11 таблици в литературния обзор, 7 фигури и 5 таблици в материал и методи с коректно цитиран източник и останалите в раздел „Резултати“.

Литературният обзор: е целенасочен, систематичен и изчерпателен. В тематично обособени раздели са представени важни особености и характеристики в биологията на раковите клетки и туморния растеж, в лекарственото лечение на ракови заболявания с акценти върху основни типове лекарствена терапия и класификация на антитуморните препарати по произход и механизъм на действие. Дискутират се предизвикателствата пред съвременната лекарствена терапия на рака и страничните ефекти с насоченост към гастро-, кардио-, невро-токсичност, анемия, фебрилна неутропения, лекарствената устойчивост/резистентност на раковите клетки и фармакогеномика. Изчерпателно са представени и анализирани наличните литературни данни върху биологичната активност на жлъчни киселини и техни производни, на метали (Zn, Cu, Ni и Co) и на нестероидни противовъзпалителни средства.

В светлината на подробно и аналитично представените научни данни в обзора, докторантката логично дефинира **целта** на дисертационния труд: „Да се изследва влиянието върху преживяемостта и пролиферативната активност на култивирани в лабораторни условия човешки и животински туморни клетки на две групи новосинтезирани съединения: комплекси на Zn(II), Cu(II) и Ni(II) с жлъчни киселини (урсодезоксихолева, дезоксихолева, хиодезоксихолева); и комплекси на Zn(II), Cu(II), Co(II) и Ni(II) с нестероидни противовъзпалителни средства (мелоксикам, пироксикам, изоксикам)“ и набелязва **5 конкретни** задачи.

Оценка на използваните материали и методи: Докторантката умело съчетава и прилага класически и съвременни методи на изследване – клетъчно-културални, цитохимични, молекулярно-биологични, цитоморфологични, микроскопски, статистически и др.. Използван е комплексен подход включващ: 4 метода за цитотоксичност (MTT, NR, CV и Trypan blue) с различни клетъчни/молекулни мишени и механизми на действие, комбиниран флуоресцентен метод за доказване на цитопатологични изменения, тест за генотоксичност (Комет анализ) при неутрално и алкално рН, 3D колонии-образуващ тест. Опитите са проведени в моделни 2D и 3D експериментални системи на 7 постоянни клетъчни туморни линии съответстващи на най-често срещани онкологични заболявания и на 3 трансформирани с вируси животински клетъчни линии от плъх и пиле експресиращи съответно *v-src* и *v-myc* онкогени, като са използвани необходимите контроли и стандарти. Приложени са адекватни статистически

методи и обработващи програми. Експерименталният материал е огромен, много добре структуриран и напълно достатъчен за дисертация за научната и образователна степен „Доктор“.

Оценка на получените резултати: Получените резултати са систематизирани в 2 основни раздела с по 5 подраздела в последователност следваща планираните задачи в дисертацията. В самостоятелни раздели са представени резултатите за конвенционалните антитуморни препарати (цисплатина, оксалиплатина, епирубицин) и DMSO използвани в експериментите съответно като позитивни контроли и разтворител на изследваните съединения.

В опити *in vitro* в 2D моделни системи на 3 групи перманентни клетъчни линии (човешки и животински - птичи и плъши, туморни и нетуморни) чрез прилагане на четири различни метода за цитотоксичност - MTT, NR, CV и TB, е установена различна по степен цитотоксичност при отделните клетъчни линии за различните метални комплекси и техните лиганди (жлъчни киселини и НСПВС). В повечето случаи тестваните метални комплекси на жлъчните киселини и на НСПВС проявяват по-висока цитотоксичност в сравнение със самостоятелно приложените лиганди и по-ниска цитотоксичност спрямо стандартните цитостатици използвани като позитивна контрола. Изчислени са цитотоксичните концентрации (IC_{50} и IC_{90} в $\mu\text{g/ml}$) за съответните съединения, на базата на които изследваните съединения са степенувани в йерархични редове и са представени в подробни таблици, които улесняват анализа на получените резултати.

С най-силно изразено цитотоксично действие се отличават металните комплекси на дезоксихолева киселина (DCA), пироксикам (Pir) и мелоксикам (Mel). При човешките туморни клетки с по-висока цитотоксичност се открояват комплексите на дезоксихолева киселина: Zn-DCA при HeLa и MCF-7, Cu-DCA при HT-29, Ni-DCA при HepG2. Към металните комплекси на пироксикам (Cu-Pir, Ni-Pir и Co-Pir) най-висока чувствителност показват клетките от линия MCF-7. Най-силен цитотоксичен ефект проявява комплексът Ni-Pir при клетките от линия A549, а комплекса Co-Iso - при HeLa. Антипролиферативният и цитотоксичен ефекти на мелоксикамът и неговите метални [Zn(II), Cu(II), Co(II), Ni(II)] комплекси е време- и концентрация зависим. Комплексът Cu-Mel показва най-висока цитотоксична активност при клетките от линии HeLa, HT29 и A549. Висока цитотоксична активност е отчетена за Zn-Mel при глиобластомни клетки от линия 8MGBA (на второ място) и клетки от линия A549. В единични случаи цитотоксичният ефект на лиганда мелоксикам е най-силно проявен (8MGBA – 96 час).

При птичите хепатомни клетки (LSCC-SF-Mc29) най-изразен цитотоксичен ефект проявява комплексът Ni-Mel като ефекта е по-силен от

този на самостоятелно приложения лиганд-мелоксикам. При плъщите саркомни клетки (LSR-SF-SR) обаче, най-силно изразен е ефекта на мелоксикам и комплексът му Zn-Mel.

Чрез комбиниран флуоресцентен метод са доказани цитопатологични изменения в изследвани човешки и животински туморни клетки (HeLa, плъщи саркомни клетки от линия LSR-SF-SR, мултиформен глиобластом линия 8MGBA, колоректален карцином у човек от линия HT29 и др.), след третиране с изследваните новосинтезирани метални комплекси и техните лиганди.

Установена е генотоксичност чрез Комет анализ на новосинтезираните метални комплекси при неутрално (при MCF-7 луминален тип А рак на млечната жлеза при човек) и алкално pH (при HT29 - рак на дебелото черво у човек).

Установено е инхибиращо влияние върху 3D колонии-образуващата способност в полутечна среда на човешки и животински туморни клетки (от линии LSCC-SF-Mc29, LSR-SF-SR, MCF-7, HT29 и HepG2) след третиране с лиганди и метални комплекси на жлъчните киселини и НСПВС.

Получените резултати са убедителни, подробно онагледени със 77 фигури съставени от многокомпонентни графики или снимки и 14 таблици, които са детайлно анализирани в раздел „Обсъждане“ в съответствие с достъпната научна литература, целта и задачите на дисертацията. Извършените изследвания са впечатляващи по обем и методологичен обхват, като са използвани необходимите контроли и статистически методи за верификация на получените резултати, което позволява да се даде положителна и много висока оценка на проведените изследвания и резултати.

На базата на резултатите от проведените изследвания са дефинирани **6 основни изводи**, които напълно приемам. Те отразяват най-съществените постижения и закономерности по отношение наблюдаваните ефекти и вероятните механизми на антитуморно действие в моделни експериментални туморни и нетуморни системи след третиране с метални комплекси на жлъчни киселини и НСПВС и техни лиганди.

Приноси. В резултат на проведеното широкомащабно и комплексно научно изследване върху антитуморния ефект на 20 новосинтезирани съединения (включващи 8 метални комплекси на жлъчни киселини и 12 на НСПВС) и 6 техни лиганди са изведени научни приноси с оригинален, потвърдителен и приложен характер, които могат да бъдат систематизирани както следва:

Оригинални приноси

1. За пръв път са получени данни за влиянието на 20 новосинтезирани съединения: осем комплекса на Zn(II), Cu(II) и Ni(II) с жлъчни киселини

(урсодезоксихолева, дезоксихолева и хиодезоксихолева) и 12 комплекса на Zn(II), Cu(II), Ni(II) и Co(II) с НСПВС (мелоксикам, пироксикам, изоксикам) върху преживяемостта и пролиферативната активност на култивирани в лабораторни условия туморни и нетуморни клетки с човешки и животински произход.

2. Доказано е, че изследваните нови метални комплекси (с малки изключения) проявяват по-силно изразено цитотоксично действие върху култивирани в лабораторни условия злокачествено трансформирани клетки, в сравнение със самостоятелно приложените лиганди (жлъчни киселини и НСПВС).

3. За пръв път е доказана способността на изследваните жлъчни киселини и НСПВС да потискат 2D- и 3D растежа на култивирани в лабораторни условия клетъчни линии от предизвикани с птичи левкозни и саркомни ретровируси трансплантируеми тумори (хепатом у пиле и сарком у плъх), експресиращи онкогените *v-myc* (линия LSCC-SF-Mc29 и полученият от нея клон E7) и *v-src* (LSR-SF-SR), чиито клетъчни аналози участват в патогенезата на голям брой неоплазии у човека и животните.

Приноси с потвърдителен характер

1. Потвърдена е цитотоксичната активност на жлъчни киселини и НСПВС по отношение на човешки клетъчни линии, получени от колоректален карцином, мултиформен глиобластом, недребноклетъчен рак на белия дроб, аденокарцином на млечна жлеза, цервикален и хепатоцелуларен карцином.

2. Потвърдена е високата чувствителност на птичите хепатомни клетки от линия LSCC-SF-Mc29 и полученият от нея клон E7 към цитотоксичното действие на вещества с различна структура и химични/хизико-химични свойства.

Приноси с приложен характер

1. Разработен, оптимизиран и приложен е комплексен подход за изучаване на цитотоксичните / антитуморните свойства на комплекси на метали с жлъчни киселини и НСПВС при клетъчни линии, получени от човешки и животински тумори с различна етиология и произход, включващ методи с различни молекулни/клетъчни мишени и механизми на действие, краткосрочни и дългосрочни експерименти, монослойни (2D) култури и триизмерни (3D) колонии в полутечна среда.

Приносите са безспорни, обогатяват науката с нови оригинални научни факти и са с потенциално значение за експерименталната онкофармакология и онкотерапия, клетъчната/молекулна токсикология, медицинската химия и клиничната практика. Приемам така изложените приноси в дисертационния труд.

Критични бележки, препоръки, въпроси: Нямам критични бележки по същество. С докторанта са обсъдени грешки от технически характер, използване на термини с буквален превод, уеднаквяване параметрите на някои фигури, пропуснати автори, повечето от които са отстранени в крайния вариант. Дисертационният труд като цяло е написан на много добър научен и литературен език.

Във връзка с дисертацията са представени 11 научни публикации, отпечатани на английски език, с общ сбор точки 72.53, при изискуеми 30, разпределени както следва: показател Г.7.1- 5 публикации с ОИФ - 3.184 и общ брой точки – 42.64; показател Г.7.2 - 2 публикации с общ брой точки – 17.50; показател Г.8.1 - 4 публикации с общ брой точки – 12.39.

Основната част от научните изследвания докторантката е осъществила в изследователските лаборатории на секция “Синаптична сигнализация и комуникации“, на Институт по невробиология (ИНБ), БАН и на секция “Патология“ на ИЕМПАМ-БАН, с финансовата подкрепа на научни проекти финансирани от външни и национални източници (ФНИ, COST-акции, двустранни проекти и др.). Научни резултати по темата на дисертацията са представени с 61 доклада на национални и международни научни форуми. Открити са 4 цитати в чужбина, което доказва международно признание.

Оценка на Автореферата. Оформен е много добре графично в съответствие с дисертационния труд. В резюмиран вид отразява методологията и последователността на проведените изследвания, получените резултати, направените изводи и приноси. Отлично впечатление прави включеното Резюме на дисертационния труд на български и английски език на страниците на Автореферата.

Биографични данни: Лора Владимирова Дякова е родена през 1985г в гр. Дупница. Завършва с отличен успех Биологически факултет на СУ “Климент Охридски“, през 2008г – Бакалавър по специалност „Молекулярна биология“ и през 2010г – Магистър по специалност „Вирусология“. От 2013 г е задочен докторант в секция “Синаптична сигнализация и комуникации“ на Институт по невробиология (ИНБ), БАН. Положила е изпити за докторантски минимум, изпълнила е образователната програма и е надвишила изискуемите количествени критерии около десет пъти (събрала е 2390 кредита при изискуеми 250).

Придобита компетентност съобразно изискванията на образователната и научна степен „Доктор“. За изпълнение на експерименталната работа на дисертационния труд, задочен докторант Лора Владимирова Дякова демонстрира основни теоритични познания в областта на темата на дисертацията, умения за правилен подбор на комплексна методология и подходящи моделни *in vitro* системи, и практически умения за

провеждане на научно-изследователска дейност. Придобила е опит да анализира, обобщава и обективно да дискутира и презентира научни резултати, да извежда конкретни изводи и да оформя научни статии, които напълно съответстват на изискванията на образователната и научна степен „Доктор”.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Задочен докторант Лора Владимирова Дякова представя дисертационен труд посветен на актуална научна проблематика в областта на експерименталната онкофармакология и онкотерапия - а именно комплексна оценка на антитуморния потенциал на новосинтезирани метални комплекси на жлъчни киселини и нестероидни противовъзпалителни средства и тяхното значение за бъдещо приложение в клиниката за лечение на няколко вида рак. Дисертационният труд е мащабно, обосновано, прецизно изпълнено и богато онагледено научно изследване и напълно покрива, а в някои аспекти значително надвишава научните и образователни критерии за докторска степен залегнали в Закона за развитие на Академичния състав в РБ и правилника за неговото приложение, във вътрешните правилници на БАН и ИЕМПАМ при БАН. При изпълнение на дисертационния труд Лора Дякова е овладяла и успешно прилага комплекс от съвременни методични подходи и техники, придобила е способност самостоятелно и иновативно да решава научни проблеми, творчески да анализира експериментални резултати и да оформя научни публикации.

Всичко това ми позволява с вътрешна убеденост да изразя положителното си мнение, да дам висока оценка на разработения дисертационен труд и да предложа на членовете на почитаемото Научно жури да гласуват с „ДА” за присъждане на Образователната и научна степен „Доктор” на Лора Владимирова Дякова в Професионално направление 7.1. "Медицина", Научна специалност "Фармакология" 03.01.24.

02.05. 2019г., София

Рецензент:

/проф. д-р Ренета Тошкова/